昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，March 2008，51(3)：307 – 314　ISSN 0454-6296

九种绢丝昆虫线粒体 12S rRNA 基因的序列特征和系统发育分析

刘彦群[1,2,*]，靳向东[3]，秦利[1]，鲁成[2]，向仲怀[2]

（1. 沈阳农业大学生物科学与技术学院，沈阳　110161；2. 西南大学农业部蚕桑学重点开放实验室，重庆　400716；
3. 吉林省蚕业科学研究所，吉林永吉　132200）

摘要：为探讨鳞翅目中绢丝昆虫之间的系统发育关系和分子进化特征，本研究测定了中国柞蚕 *Antheraea pernyi* 野生型和放养型的线粒体 12S rRNA 基因的部分序列，结合来自 GenBank 数据库的 17 条序列，对总共 9 种绢丝昆虫（2 科 3 属）的 12S rRNA 基因序列进行了分析。利用软件 MEGA 3.1 进行碱基组成、变异位点的统计和分子进化分析，分别用类平均聚类法((UPGMA)、邻接法(NJ)、最小进化法(ME)、最大简约法(MP)重建系统发生树。测定的中国柞蚕野生型的 12S rRNA 基因序列(427 bp)与放养型‘豫早 1 号’的序列完全一致。序列对齐后共鉴定 80 个变异位点，50 个简约信息位点。碱基组成分析显示在科属间具有明显差异，AT 含量蚕蛾科高于大蚕蛾科；在 A 和 T 碱基的使用上，大蚕蛾科偏好使用 T，而蚕蛾科则偏好使用 A。与动物中常见的以转换为主的碱基替换模式不同，所分析的 9 种昆虫中除桑蚕属内部为转换与颠换基本一致外，其余物种间均是颠换多于转换。进化分析支持柞蚕属、樗蚕属和桑蚕属的单系。基于 UPGMA 法的进化树支持琥珀蚕是柞蚕属的较原始类型，而 NJ、ME 和 MP 法则支持印度柞蚕是较原始的类型，因此，柞蚕属种间的进化关系尚需进一步研究。

关键词：绢丝昆虫；蚕蛾科；大蚕蛾科；12S rRNA 基因；碱基组成；替换模式；系统发生关系

中图分类号：Q969　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)03-0307-08

Characterization and phylogenetic analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene sequences from nine species of silk-producing insects

LIU Yan-Qun[1,2,*], JIN Xiang-Dong[3], QIN Li[1], LU Cheng[2], XIANG Zhong-Huai[2] (1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China; 3. Sericultural Institute of Jilin Province, Yongji, Jilin 132200, China)

Abstract: The nucleotide composition and substitution pattern of the partial mitochondrial 12S rRNA gene from nine species of silk-producing insects were investigated. The phylogenetic relationships among the nine species were then assessed by the methods of unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), neighbor-joining (NJ), minimum evolution (ME), and maximum parsimony (MP). The 12S rRNA gene sequences of 427 bp of the wild *Antheraea pernyi* are identical to the semi-domestic *A. pernyi* (Yuzao No. 1). The genera *Antheraea*, *Samia*, and *Bombyx* show obviously different nucleotide composition: i) the AT content of Bombycidae family is higher than that of Saturniidae; ii) the nucleotide of *Antheraea* and *Samia* (Saturniidae) contains more Ts than As, while more As than Ts exist in *Bombyx* (Bombycidae). By analyzing the nucleotide substitution pattern, more transitions than transvertions were found among these species except *Bombyx*. All of the phylogenetic trees showed monophyly for the three genera, and the confidence limits were measured more than 96% for the clades. However, the phylogenetic tree based on UPGMA method supported the ancestral position of *A. assama* within Antheraea species, whereas all the trees using NJ, ME, and MP methods backed up the ancestral position of *A. mylitta*, suggesting that the phylogenetic relationship among

---

基金项目 沈阳农业大学青年教师科研基金(20070112)

作者简介 刘彦群，男，1973 年生，山西绛县人，博士，副研究员，从事昆虫资源生物学与分子系统学研究，E-mail：liuyqlyp@yahoo.com.cn

[*] **通讯作者** Author for correspondence, E-mail：liuyqlyp@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2007-09-23；**接受日期** Accepted：2008-12-20

Antheraea members need to be further studied with more molecular markers.

Key words: Silk-producing insects; Bombycidae; Saturniidae; 12S rRNA gene; nucleotide composition; substitution pattern; phylogenetic relationship

目前已经利用并对人类做出巨大贡献的绢丝昆虫主要来自鳞翅目蚕蛾科(Bombycidae)和大蚕蛾科(Saturniidae)。蚕蛾科的家蚕 *Bombyx mori* 是研究最为深入的昆虫模式系统之一,最近完成的全基因组序列(Mita *et al*.,2004;Xia *et al*.,2004)为研究广范围的生物学问题提供了许多必需的分子遗传资源(Nagaraju and Goldsmith,2002)。大蚕蛾科的绢丝昆虫种类十分丰富,如中国柞蚕 *Antheraea pernyi*、日本柞蚕 *A. yamamai*、印度柞蚕 *A. mylitta*、温带柞蚕 *A. roylei*、柞塔色蚕 *A. proylei*、琥珀蚕 *A. assama*、蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 等。以这些绢丝昆虫为基础的蚕丝业广泛分布于中国、印度、日本、印度尼西亚、泰国等国家。现有的一些基于分子标记的研究主要侧重于对蚕蛾科家蚕和野桑蚕 *B. mandarina* 的分析,对大蚕蛾科绢丝昆虫尤其是柞蚕属遗传背景的了解还十分有限(Arunkumar *et al*., 2006;Mahendran *et al*.,2006)。大蚕蛾科绢丝昆虫仍主要根据表型性状如卵纹、幼虫表皮刚毛突起的排列方式、染色体组型等进行分类(Sinha *et al*.,1994)。虽然分类和系统进化研究对于这些重要遗传资源的保护和育种是非常必要的,但是,相比于其他种类昆虫如果蝇,这些绢丝昆虫之间的系统进化关系的信息还比较缺乏(Hwang *et al*.,1999;程道军等,2002;Arunkumar *et al*.,2006)。

线粒体基因组具有母性遗传、结构简单、大小适中、缺乏重组、进化速率相对较快等特点(Boore,1999),已广泛应用于种群遗传学、系统发生学、分子进化研究(廖顺尧,2000;Nardi *et al*.,2003)。其中的rRNA基因同时具有易变区和保守区,可广泛应用于分子进化和系统发生研究(Mindell and Honeycutt,1990)。Hwang等(1999)最先利用12S rRNA基因序列研究了家蚕、野桑蚕,以及中国柞蚕、日本柞蚕的系统进化关系。Arunkumar等(2006)利用12S rRNA基因结合其他序列对家蚕、日本野桑蚕和中国野桑蚕,以及中国柞蚕、温带柞蚕及二者杂交种柞塔色蚕进行了分子系统学研究。为探讨鳞翅目大蚕蛾科和蚕蛾科绢丝昆虫之间的系统发育关系和分子进化特点,本研究测定了中国柞蚕野生型和放养型的线粒体12S rRNA基因的部分序列,结合从GenBank数据库获得的17条序列,对总共9种绢丝昆虫(2科3属)的12S rRNA基因序列的碱基组成、分子进化特点进行了分析,并构建分子系统树探讨它们之间的系统发生关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料和DNA数据来源

本研究中的9种绢丝昆虫列于表1。野生型中国柞蚕采集于贵州(‘贵州野柞蚕’),由河南省云阳蚕业试验场提供。单个蛹在STE缓冲液中匀浆后,利用差速离心方法(600 g/min / 10 000 g/min)分离线粒体,然后用碱裂解法提取线粒体DNA(Koichiro,1998)。根据放养型中国柞蚕的序列(AY242996)设计了一对引物Ap-12SrRNA1(5′-TACTT TGTTA CGACT TAT-3′)和Ap-12SrRNA2(5′-AAACT AGGAT TAGAT ACCC -3′)。利用该对引物在45℃退火时扩增得到一条特异性PCR产物,该扩增产物连接到pGEM-T easy载体上进行序列测定。测序反应用Prism™ BigDye Terminator Ready Reaction v3.1试剂盒(Applied Biosystem Inc.)在ABI 310型遗传分析仪上进行。所测定序列的GenBank登录号为EU313949。

放养型中国柞蚕‘豫早1号’的序列来自于我们所测定的线粒体基因组全序列(GenBank登录号AY242996)。其余序列均下载自GenBank数据库,包括目前所有相关绢丝昆虫的12S rRNA基因序列。以果蝇(*Drosophila melanogaster*,NC_001709)(代码为Dm)的序列作为序列分析比较的外群。

1.2 序列分析方法

利用软件Clustal X(Thompson *et al*.,1997)进行序列比对,然后再进行人工检查校对。利用软件MEGA 3.1(Kumar *et al*.,2004)进行碱基组成、变异位点包括简约信息位点的统计和分子进化分析。碱基偏好度Skewness分析按Perna和Kocher(1995)方法进行,其中AT skew=(A-T)/(A+T),GC skew=(G-C)/(G+C)。用4种建树方法即类平均聚类法(UPGMA)、邻接法(NJ)、最小进化法(ME)、最大简约法(MP)重建系统发生树,构建时基于Kimura 2-parameters模型。系统树中分支的置信水平用自引导检验(Bootstrap test)估计,重复1 000次。

表 1　本研究中的 9 种绢丝昆虫

Table 1　The nine species of the silk-producing insects used in this study

种名 Species	代码 Code	品种或产地 Variety or source	丝 Silk	基因登录号 GenBank accession no.
大蚕蛾科 Saturniidae				
中国柞蚕 *Antheraea pernyi*	Ap1	**豫早 1 号，中国河南** Yuzao No. 1，Henan，China	**柞丝** Oak	AY242996
	Ap2	**野柞蚕，中国贵州** Wild *A. pernyi*，Guizhou，China	**柞丝** Oak	EU313949
	Ap3	**未知** Unknown	**柞丝** Oak	AY037834
日本柞蚕 *Antheraea yamamai*	Ay1	**未知** Unknown	**天丝** Tensan	AY037835
	Ay2	**日本** Japan	**天丝** Tensan	AF029064
印度柞蚕 *Antheraea mylitta*	Am	**印度** India	**塔色丝** Tasar	AY037833
温带柞蚕 *Antheraea roylei*	Ar	**印度** India	**柞丝** Oak	AY037832
柞塔色蚕 *Antheraea proylei*	Apr	**印度** India	**柞丝** Oak	AY037831
琥珀蚕 *Antheraea assama*	Aa	**印度** India	**琥珀丝** Muga	AY037830
蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini*	Scr	**印度** India	**爱丽丝** Eri	AY037829
蚕蛾科 Bombycidae				
家蚕 *Bombyx mori*	Bm1	Xiafang，**中国** China	**桑丝** Mulberry	AY048187
	Bm2	Aojuku，**日本** Japan	**桑丝** Mulberry	AB083339
	Bm3	Backokjam，**韩国** Korea	**桑丝** Mulberry	AF149768
	Bm4	C-108，**中国** China	**桑丝** Mulberry	AB070264
	Bm5	**未知** Unknown	**桑丝** Mulberry	AF029065
野桑蚕 *Bombyx mandarina*	Bman1	**中国山东** Shangdong，China	–	DQ263226
	Bman2	**日本** Japan	–	AB070263
	Bman3	**未知** Unknown	–	AF029066

2　结果

2.1　9 种绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的碱基组成特征

本文测定的中国柞蚕野生型的 12S rRNA 基因序列长度为 427 bp（GenBank 登录号 EU313949），A，T，C，G 4 种碱基的组成分别为 38.4%，6.6%，44.0%，11.0%，AT 含量高达 82.4%，并且与放养型"豫早 1 号"的序列完全一致（AY242996 对应于全序列的 14 268 ～ 14 694 bp）。与 GenBank 公布的 Ap3（AY037834）的序列相比，本文测定的序列短一个碱基，并且存在两个变异位点，包括一个碱基的颠换（A / T）和一个碱基的缺失（T / –）（图 1）。日本柞蚕 Ay1（AY037835）和 Ay2（AY029064）的碱基组成也基本一致，但有 15 个位点发生变异，包括 3 个插入/缺失、9 个颠换和 3 个转换（图 1）。

对 9 种绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的碱基组成分析结果见表 2。总体上看，蚕蛾科的 AT 含量要高于大蚕蛾科。3 个属间相比，AT 含量以樗蚕属最低，柞蚕属居中，桑蚕属最高。碱基 A 的含量以柞蚕属最低，樗蚕属居中，桑蚕属最高；而 T 的含量则恰相反，以桑蚕属最低，樗蚕属居中，柞蚕属最高。碱基 G 和 C 的含量均为桑蚕属最低，柞蚕属居中，樗蚕属最高。

柞蚕属 6 个种之间的碱基组成差异不明显，中国柞蚕的碱基组成和 AT 含量在其中属于中等大小。AT 含量最高的是印度柞蚕（83.0%），温带柞蚕最低（82.1%）。柞塔色蚕的碱基 A 含量最高（39.5%），温带柞蚕最低（37.9%）；印度柞蚕的 T 含量最高（44.5%），日本柞蚕 Ay2 最低（43.2%）。

Perna 和 Kocher（1995）将偏好度 Skewness 引入线粒体基因序列的碱基组成分析，其中 As 对 Ts 的相对数量用 AT skew 表示［AT skew = （A – T）/（A + T）］，Gs 对 Cs 的相对数量用 GC skew 表示［GC skew = （G – C）/（G + C）］。对 9 种绢丝昆虫的 Skewness 分析结果见表 2。中国柞蚕 Ap1 / 2 的 12S rRNA 基因序列的 AT skew 为 –0.068，Ap3 的 AT skew 为 –0.064。柞蚕属的 6 个种中，AT skew 最高的是温带柞蚕（–0.077），最低的是柞塔色蚕（–0.046）。需要指出的是，日本柞蚕的 Ay1 和 Ay2 序列之间的 AT skew 相差很明显。柞蚕属 6 个种的 AT skew 平均为 –0.064，表明柞蚕属的 12Sr RNA 基因偏好使用 Ts。蓖麻蚕也有偏好使用 Ts 的趋势（AT skew = –0.028），但这种倾向弱于柞蚕属。与柞蚕属和樗蚕属不同的是，桑蚕属的 12S rRNA 基因偏好于使用

As，其 AT skew 在 0～0.008 之间。虽然 G 和 C 的绝对含量有明显差异，均是桑蚕属最低，樗蚕属最高，但它们的 GC skew 比较接近。

表 2　9 种绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的碱基组成以及偏好性

Table 2　Nucleotide composition and skewness of the 12S rRNA gene sequences for silk-producing insects

	Length (bp)	A%	G%	T%	C%	A+T %	AT skew	GC skew
柞蚕属 *Antheraea*								
Ap1/2	427	38.4	6.6	44.0	11.0	82.4	－0.068	－0.250
Ap3	428	38.6	6.5	43.9	11.0	82.5	－0.064	－0.257
Ay1	431	39.0	6.7	43.2	11.1	82.2	－0.051	－0.247
Ay2	430	38.8	6.7	44.0	10.5	82.8	－0.063	－0.221
Am	429	38.5	6.5	44.5	10.5	83.0	－0.072	－0.235
Ar	419	37.9	7.2	44.2	10.7	82.1	－0.077	－0.196
Apr	425	39.5	6.4	43.3	10.8	82.8	－0.046	－0.256
Aa	432	38.4	6.7	44.4	10.4	82.8	－0.072	－0.216
平均 Average		38.6	6.7	43.9	10.8	82.5	－0.064	－0.234
樗蚕属 *Samia*								
Scr	435	39.8	6.9	42.1	11.3	81.9	－0.028	－0.243
桑蚕属 *Bombyx*								
Bm1	431	42.0	6.3	42.0	9.7	84.0	0	－0.213
Bm2	431	42.2	6.0	42.0	9.7	84.2	0.002	－0.234
Bm3	431	42.2	6.0	42.0	9.7	84.2	0.002	－0.234
Bm4	431	42.2	6.0	42.0	9.7	84.2	0.002	－0.234
Bm5	431	42.5	6.0	41.8	9.7	84.3	0.008	－0.236
Bman1	432	42.1	6.0	42.1	9.7	84.2	0	－0.234
Bman2	431	42.5	6.0	42.0	9.5	84.5	0.006	－0.226
Bman3	432	42.4	6.0	41.9	9.7	84.3	0.006	－0.236
平均 Average		42.3	6.0	42.0	9.7	84.3	0.004	－0.236
果蝇 Dm	430	37.7	9.8	38.8	13.7	76.5	－0.014	－0.166

DM：**果蝇** *Drosophila melanogaster*. **表** 3 **同** The same for Table 3.

```
                                 11111111 1111111122 2222222222 222222233 33333333333 3444444444
          222222233 3334666777 8801122233 3334444801 1111111222 344445503 34577777888 9000001122
         5023456801 2366379018 2653446701 3480134480 1345689347 815688995 98701789349 7234580123
Ap1/2    TT-AATTAAT ATAGTTATTT TTCCTAATCA TTTAC-AATT CCTTTTATTA TCAAATTTGG TTCA---TTA TATATA-T-T
Ap3      A.T....... .......... .......... .....-.... .......... .......... ....---... ......-.-.
Apr      AA-......- ...AG..... .......... .....-.... .......... .......... ....---... ......-.A.
Ar       A---..AG.. ..G....... .......... ...TTT.... ......T... ....G..... ....---... ......-.-.
Ay1      A.T....... .......... .......... ...T.C..A. ..A....... .......... ....---... A.....A.G.
Ay2      AC-....... .......... A......... ...T.AT... TT.A...... .T...A.... ....---... .T....T.TG
Am       AC-.....T. .......... ......T... ..ATTAT.A. T......... .T...A.... ....---... AT....T.T-
Aa       A.ATT.A.T. .......... ....C..... ...TTAT.A. TTA......T .T.....C.. ....---... A.....-.-.
Scr      A.-..C.... TA......AC ......TA.T C.ATT-..A. TT..A.TA.. AT....A... AG..ATTC.C AGATCTA.TA
Bm1      ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A.GAC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bm2      ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bm3      ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bm4      ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bm5      A.-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bman1    ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bman2    ..-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AA.T.A..AC TT.AAATAA. ATTT.A.AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT-
Bman3    A.-.....TA .....ATAA. AATA.TT.A. AACT.A..AC TT.AAATAA. ATTT...AAA .ATTTAA.A. ATA...-AT.
```

图 1　9 **种绢丝昆虫** 12S rRNA **基因序列对齐后的变异位点**

Fig. 1　Variable sites of the alignments of the 12S rRNA gene sequences of nine species of silk-producing insects

序列对齐后全长 440 bp，**有** 80 **个变异位点，其中简约信息位点** 50 **个序列。上面的数字表示变异位点。“ . ’表示相同碱基；“ － ’表示缺失。** Eighty variable sites and 50 parsimony informative sites were detected from the alignments with a total of 440 bp in length. The number on the sequence refers to the variable sites. . : Identical ; － : Indel.

2.2 9 种绢丝昆虫 12SrRNA 基因序列的变异

9 种绢丝昆虫的序列对齐后全长 440 bp（包括插入和缺失），其中保守性位点有 358 个，变异位点 80 个（占总位点数的 18.05%），简约信息位点 50 个（图 1）。柞蚕属 6 个种之间的保守性位点有 397 个，变异位点 35 个（占总位点数的 7.90%），其中简约信息位点 15 个。而桑蚕属 2 个种 8 条序列之间的保守性位点共有 427 个，变异位点只有 4 个（第 5，138，184 和 258 位），简约信息位点仅 1 个（第 5 位）。基于 Kimura 2-parameters 模型计算了两两序列间的遗传距离（表 3），蓖麻蚕与柞蚕属各种的平均遗传距离（0.080；0.067 ~ 0.086）远小于其与桑蚕属的平均遗传距离（0.114；0.111 ~ 0.117）。柞蚕属 6 个种间的遗传距离在 0.005 ~ 0.043 之间，最小的遗传距离是中国柞蚕与柞塔色蚕，最大的遗传距离是柞塔色蚕与琥珀蚕。桑蚕属内各序列高度一致，表明它们之间的亲缘关系非常近。虽然内部种间或各序列间的遗传距离极小（0 ~ 0.007），但也可以微弱反应出不同地区野桑蚕与家蚕各品种之间的遗传距离远近，其中中国野桑蚕与家蚕各品种之间的平均遗传距离最小（0.0008），而野桑蚕 Bman3 和日本野桑蚕与家蚕各品种的平均遗传距离分别为 0.002 和 0.006。

碱基替换分析表明，这些绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列两两之间变异基本上是颠换多于转换（表 3），例外是桑蚕属的序列之间转换数与颠换数基本一致。颠换主要以 AT 为主，而转换则以 CT 为主（数据未出示）。柞蚕属的 8 条序列之间平均发生转换 3.9 次，颠换 7.6 次，转换与颠换之比为 0.514。柞蚕属与蓖麻蚕之间平均发生转换 9.5 次，颠换 23.25 次，转换与颠换之比为 0.409。而桑蚕属与蓖麻蚕之间平均发生转换 10.9 次，颠换 36.3 次，转换与颠换之比为 0.300。柞蚕属与桑蚕属之间平均发生转换 9.1 次，颠换 33.7 次，转换与颠换之比为 0.270。桑蚕属的 8 条序列之间仅发生转换 16 次（平均 0.57 次），颠换 15 次（平均 0.54 次），转换与颠换之比为 1.067。9 种绢丝昆虫的序列与果蝇的序列相比，也均是颠换数大于转换数。

表 3　9 种绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的转换数/颠换数（上三角）和序列差异（下三角）

Table 3　Numbers of transition/transversion（above diagonal）and genetic distances（below diagonal）for 12S rRNA gene sequences

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ap1/2	[1]		0/1	1/3	4/4	0/5	5/9	4/8	6/11	10/23	9/33	10/33	9/33	8/34	9/33	9/34	9/34	8/34	34/60
Ap3	[2]	0.002		1/2	4/3	0/4	4/9	4/7	6/11	10/23	9/34	10/34	9/34	8/35	9/34	9/33	9/33	8/35	33/60
Apr	[3]	0.007	0.005		5/4	2/6	4/12	4/10	7/12	11/25	11/36	9/37	10/36	10/36	10/36	10/35	10/35	9/37	32/62
Ar	[4]	0.020	0.017	0.022		5/5	5/11	7/9	8/9	12/21	14/34	13/34	13/34	13/34	13/34	13/33	13/33	12/35	30/62
Ay1	[5]	0.012	0.010	0.015	0.022		4/10	4/12	6/8	10/21	9/34	10/34	9/34	8/35	9/34	9/33	9/33	8/35	34/58
Am	[6]	0.033	0.030	0.035	0.038	0.025		2/7	4/9	7/21	8/31	8/32	8/31	8/31	8/31	8/30	8/30	8/30	31/55
Ay2	[7]	0.025	0.022	0.027	0.035	0.027	0.022		4/13	8/26	7/32	8/32	7/32	7/32	7/32	7/32	7/31	6/31	30/60
Aa	[8]	0.040	0.038	0.043	0.040	0.027	0.027	0.035		8/26	8/36	9/36	8/36	8/36	8/36	8/35	8/35	7/37	32/58
Scr	[9]	0.083	0.080	0.086	0.083	0.075	0.067	0.080	0.083		11/36	11/37	11/36	11/36	11/36	10/37	11/35	11/37	31/65
Bman1	[10]	0.108	0.111	0.117	0.119	0.105	0.097	0.097	0.111	0.114		1/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	1/1	31/58
Bm1	[11]	0.111	0.114	0.119	0.122	0.108	0.100	0.100	0.114	0.116	0.002		1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	2/1	32/58
Bm4	[12]	0.108	0.111	0.117	0.119	0.105	0.097	0.097	0.111	0.114	0.000	0.002		0/0	0/0	0/1	0/1	1/1	30/59
Bm3	[13]	0.108	0.111	0.117	0.119	0.105	0.097	0.097	0.111	0.114	0.000	0.002	0.000		0/0	0/1	0/1	1/1	31/58
Bm2	[14]	0.108	0.111	0.117	0.119	0.105	0.097	0.097	0.111	0.114	0.000	0.002	0.000	0.000		1/0	1/0	1/1	31/58
Bman3	[15]	0.111	0.108	0.114	0.116	0.102	0.094	0.094	0.108	0.111	0.002	0.005	0.002	0.002	0.002		0/0	1/2	31/57
Bm5	[16]	0.111	0.108	0.114	0.116	0.102	0.094	0.094	0.108	0.111	0.002	0.005	0.002	0.002	0.002	0.000		1/2	30/58
Bman2	[17]	0.108	0.111	0.117	0.119	0.105	0.094	0.091	0.111	0.117	0.005	0.007	0.005	0.005	0.005	0.007	0.007		30/57
Dm	[18]	0.254	0.251	0.258	0.261	0.244	0.224	0.241	0.237	0.258	0.231	0.234	0.231	0.231	0.231	0.227	0.227	0.224	

2.3 分子系统树的构建

根据核苷酸序列对齐的结果，以果蝇为外群，利用软件 MEGA 3.1 采用 4 种建树方法（UPGMA，NJ，ME，MP）重建了 9 种绢丝昆虫的系统发生树，而且 Bootstrap 检验系统树各分支大多数均得到比较高的支持率（图 2A，B）。柞蚕属、樗蚕属和桑蚕属的关系在 4 种建树方法中得到一致的拓扑结构，均构成一支单系。

柞蚕属 6 个种的系统发生关系依据聚类方法有所不同，UPGMA 法支持琥珀蚕是柞蚕属的较原始类

型（图2：A），而NJ（图2：B）、ME和MP法（数据未出示）则均支持印度柞蚕是较原始的类型，而且均有非常高的Bootstrap值支持。中国柞蚕的3条序列均能聚在一起，而日本柞蚕的2条序列在4种建树方法下均不能聚在一起，并且在系统树上的位置也不一样。桑蚕属的系统发生分析表明现代家蚕品种与中国野桑蚕的亲缘关系最近，而不是日本野桑蚕。

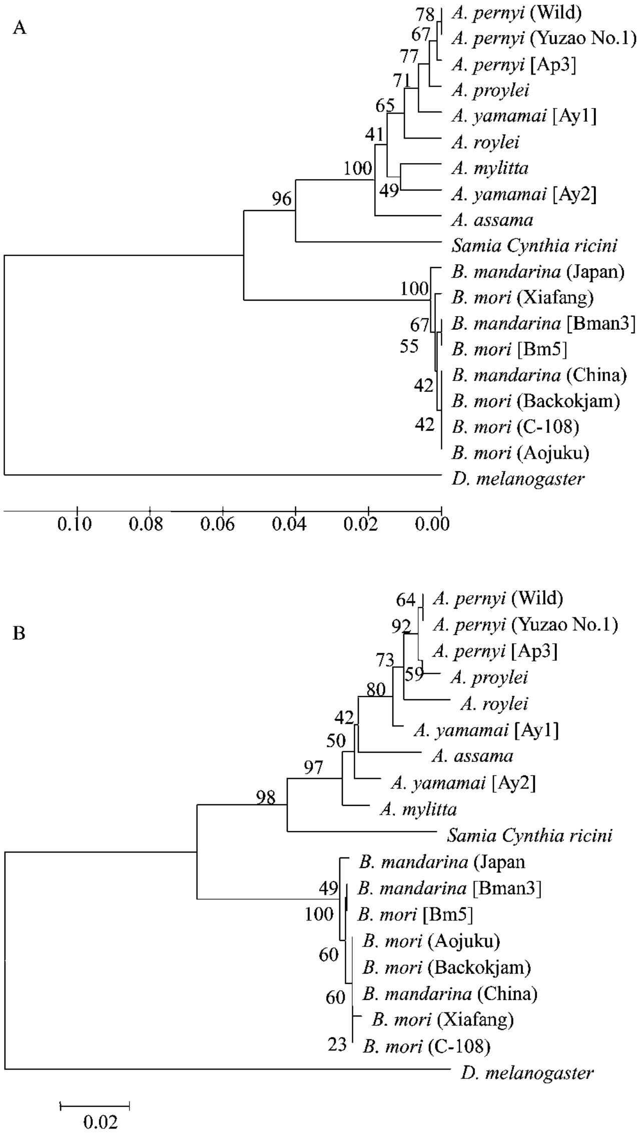

图2　基于12S rRNA基因序列构建的9种绢丝昆虫的UPGMA树（A）和NJ树（B）

Fig. 2　The UPGMA tree (A) and NJ tree (B) inferred from the partial sequences of 12S rRNA genes of nine species of silk-producing insects

果蝇为外群，支上数据为1 000个重复得到的自引导值。*D. melanogaster* was the outgroup. Bootstrap values from 1 000 replications are indicated above branches.

3　讨论

大蚕蛾科和蚕蛾科的绢丝昆虫种类十分丰富，但目前GenBank数据库中有12S rRNA基因序列可以利用的只有9种，分别属于柞蚕属、樗蚕属和桑蚕属。本研究分析了这9种绢丝昆虫12S rRNA基因序列的碱基组成和分子进化特点，并利用这些序列探讨了它们之间的系统发生关系。所分析的中国柞蚕野生型与放养型的12S rRNA基因序列高度一致，一方面从分子水平证实所发现的野生柞蚕仍属于中国柞蚕种；另一方面也为‘柞蚕是由野生柞蚕驯化而来’（章楷，1982）的观点提供了分子证据。由于驯化的年限比较短以及驯化程度比较低，它们之间的分化程度还极小，在12S rRNA基因序列上仍保持高度

一致。

9 种绢丝昆虫的 12S rRNA 基因序列均显示出很强的 AT 偏好性（81.9% ~ 84.0%），这一结果与其它昆虫的线粒体基因组表现一致（Boore，1999）。而且，碱基组成表现出明显的科属特异性，AT 含量蚕蛾科高于大蚕蛾科。在 A 和 T 碱基的使用上，大蚕蛾科与蚕蛾科也有不同的偏好性，大蚕蛾科偏好使用 T，而蚕蛾科则偏好使用 A。上述碱基组成特征也反映在中国柞蚕、家蚕与野桑蚕的线粒体基因组全序列上（未发表数据）。

一般认为，动物线粒体 DNA 的进化主要以碱基替换为主，而碱基替换又以转换为主。许多研究均发现不同属之间 12S rRNA 基因碱基变异是转换多于颠换，如鳄科的鳄类（吴孝兵等，2001）、鹭科的鸟类（常青等，2003）、斑腿蝗科的蝗虫（曾维铭等，2004）、猫科动物（郑涛等，2005）。斑腿蝗科 2 属 6 种蝗虫（*Oxya agavisa*，*O. chinensis*，*O. hyla*，*Hieroglyphus annulicornus*，*H. babian*，*H. tonkinensis*）的遗传距离仅为 0.02 ~ 0.15，而它们的 12S rRNA 基因序列变异基本上是转换多于颠换，转换与颠换之比最大的达到 4.63（曾维铭等，2004）。本研究所分析的 9 种绢丝昆虫之间具有比较小的遗传距离（< 0.119），说明它们的亲缘关系是非常近的。但是，这 9 种绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的碱基变异基本上是以颠换为主，转换数远小于颠换数。这种趋势不仅表现在 3 个属间，而且也表现在柞蚕属的种间。造成这种颠换高于转换的原因，可能是由于昆虫线粒体基因组高度富含 AT 碱基，在进化上有发生颠换大于转换的趋势（Tamura，1992；廖顺尧和鲁成，2000；Arunkumar *et al.*，2006）。这一发现也表明，大蚕蛾科昆虫的进化模式可能比较特殊，值得进一步研究。

柞蚕属是绢丝昆虫中最大的一个属，已记载有 35 种。Sinha 等（1994）根据表型性状和染色体组型等提出琥珀蚕是柞蚕属的较原始类型的观点。Mahendran 等（2006）利用 ITS1 序列的研究结果也支持琥珀蚕是柞蚕属的较原始类型。本研究利用 12S rRNA 基因序列重建这些绢丝昆虫的系统发生关系时，UPGMA 法支持琥珀蚕是柞蚕属的较原始类型，而 NJ，ME 和 MP 法均支持印度柞蚕是较原始的类型。并且，在构建的系统树中日本柞蚕的进化地位也不一致。因此，这些绢丝昆虫间的遗传进化关系仍需要利用其他的基因或更长的序列进行研究。

参考文献（References）

Arunkumar KP，Metta M，Nagaraju J，2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth，*Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*，40：419 – 427.

Boore JL，1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*，27 (8)：1 767 – 1 780.

Chang Q，Zhang BW，Jin H，Zhu LF，Zhou GY，2003. Phylogenetic relationships among 13 species of herons inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. *Acta Zool. Sin.*，49 (2)：205 – 210. [常青，张保卫，金宏，朱立峰，周开亚，2003. 从 12S rRNA 基因序列推测鹭科 13 种鸟类的系统发生关系. 动物学报，49 (2)：205 – 210]

Cheng DJ，Lu C，Zhou ZY，Xiang ZH，2002. RAPD studies on the phylogenetic relationship of several species silk-spinning insects. *Acta Sericol. Sin.*，28(4)：277 – 282. [程道军，鲁成，周泽扬，向仲怀，2002. 几种绢丝昆虫遗传多样性的 RAPD 研究. 蚕业科学，28 (4)：277 – 282]

Hwang JS，Lee JS，Goo TW，Yun EY，Sohn HR，Kim HR，Kwon OY，1999. Molecular genetic relationships between Bombycidae and Saturniidae based on the mitochondria DNA encoding of large and small rRNA. *Genet. Anal.*，15：223 – 228.

Koichiro T，Tadashi A，1988. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochem. Genet.*，26：815 – 816.

Kumar S，Tamura K，Nei M，2004. MEGA3：Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*，5：150 – 163.

Liao SY，Lu C，2000. Progress on animal mitochondrial genome. *Prog. Biochem. Biophys.*，27(5)：508 – 512. [廖顺尧，鲁成，2000. 动物线粒体基因组研究进展. 生物物理与生物化学进展，27(5)：508 – 512]

Mahendran B，Ghosh SK，Kundu SC，2006. Molecular phylogeny of silk producing insects based on internal transcribed spacer DNA1. *J. Biochem. Mol. Biol.*，39(5)：522 – 529.

Mindell DP，Honeycutt RL，1990. Ribosomal RNA in vertebrates：evolution and phylogenetic applications. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*，21：541 – 566.

Mita K，Kasahara M，Sasaki S，Nagayasu Y，Yamada T，Kanamori H，Namiki N，Kitagawa M，Yamashita H，Yasukochi Y，Kadono-Okuda1 K，Yamamoto1 K，Ajimura1 M，Ravikumar1 G，Shimomura M，Nagamura Y，Shin-i T，Abe H，Shimada T，Morishita S，Sasaki1 T，2004. The genome sequence of silkworm，*Bombyx mori*. *DNA Res.*，11：27 – 35.

Nagaraju J，Goldsmith MR，2002. Silkworm genomics：progress and prospects. *Curr. Sci.*，83：415 – 425.

Nardi F，Spinsanti G，Boore JL，Carapelli A，Dallai R，Frati F，2003. Hexapod origins：monophyletic or paraphyletic？*Science*，299：1 887 – 1 889.

Perna NT，Kocher TD，1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*，41

(3): 353 – 358.

Sinha AK, Sinha RK, Goel AK, Sinha BRRP, Thangavelu K, 1994. A review on the breeding and genetic aspect of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. In: Proceedings of the Conference on Cytology and Genetics. 4: 7 – 16.

Tamura K, 1992. The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 814 – 825.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4 876 – 4 882.

Wu XB, Wang YQ, Zhou KY, Tong ZZ, Nie JS, Wang CL, Xie WS, 2001. Systematic relationships of 8 crocodilian species suggested by 12S rRNA gene sequence. *Acta Zool. Sin.*, 47(5): 522 – 527. [**吴孝兵，王义权，周开亚，童宗中，聂继山，王朝林，谢万树**，2001. **从** 12S rRNA **基因序列探讨** 8 **种鳄类的系统学关系**. **动物学报**，47(5): 522 – 527]

Xia Q, Zhou Z, Lu C, *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1 937 – 1 940.

Zeng WM, Jiang GF, Zhang DY, Hong F, 2004. Evolutionary relationships among six Chinese grasshoppers of two genera of Catantopidae (Orthoptera: Acridoidea) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. *Acta Entomol. Sin.*, 47(2): 248 – 252. [**曾维铭，蒋国芳，张大羽，洪芳**，2004. **用** 12SrRNA **基因序列研究斑腿蝗科二属六种的进化关系**. **昆虫学报**，47 (2): 282 – 252]

Zhang K, 1982. Origin and radiation of oak silkworm in China. *Acta Sericol. Sin.*, 18(2): 112 – 116. [**章楷**，1982. **我国放养柞蚕的起源和传播考略**. **蚕业科学**，8 (2): 112 – 116]

Zheng T, Fei RM, Wu XB, 2005. Phylogeny of 13 Felidae species from China based on partial 12S rRNA and Cytb genes sequences. *Acta Zool. Sin.*, 51(4): 630 – 639. [**郑涛，费容梅，吴孝兵**，2005. **从** 12S rRNA **和** Cytb **基因部分序列研究** 13 **种猫科动物的分子系统关系**. **动物学报**，51(4): 630 – 639]

（责任编辑：袁德成）